

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSTGRADO

**Aplicación de la reacción en cadena de polimerasa
(PCR) para la detección de enterotoxinas en
Staphylococcus aureus aislados de alimentos en la
ciudad de Lima**

TESIS

para optar el grado académico de Magíster en Microbiología

AUTORA

Noemi Zuta Arriola

Lima-Perú

2009

A Dios, por darme vida y permitirme cumplir uno de mis sueños.

Mi profundo agradecimiento a mis maravillosos padres José y Macrina y a mi amada hermana Isabel, por el amor, comprensión, paciencia y el continuo apoyo en mi vida personal y profesional.

A mis grandes amores, José Luis y Gabriela Noemí, por ser fuente de motivación y de alegría cada día.

A Marlon, mi compañero y amigo, por su amor y comprensión durante todo este tiempo.

Un agradecimiento especial a la Dra. Mirtha Roque Alcarraz, docente y amiga por su orientación y experiencia profesional transmitida en la asesoría en esta tesis.

Mi gratitud al Mg. Mario Monteghirfo Gomero por su colaboración en el desarrollo de la tesis.

A los amigos del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica-UNMSM en especial Dr. Gerardo Gamarra Ballena por su disposición y apoyo brindado para la ejecución de esta investigación.

A las Autoridades de la FCS de la Universidad Nacional del Callao, por el incentivo económico concedido para la culminación de la tesis en especial a la Dra. Arcelia Rojas Salazar.

INDICE

RESUMEN

SUMMARY

I. INTRODUCCIÓN

II. GENERALIDADES

II.1 Conservación de los Alimentos y Crecimiento microbiano

II.2 *Staphylococcus aureus*

II.3 Intoxicación alimentaria por *Staphylococcus aureus*

II. 4 Enterotoxinas estafilocócicas

II.5 Métodos Analíticos para detección de Enterotoxinas

II.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1 Tipo de estudio

III.2 Lugar de Ejecución

III.3 Materiales

III.4 Metodología de Trabajo

IV. RESULTADOS

V. DISCUSIÓN

VI. CONCLUSIONES

VII. RECOMENDACIONES

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ANEXOS

RESUMEN

En el presente estudio se han aislado *Staphylococcus aureus* de quesos, embutidos y cremas chantilly, recolectados en la Ciudad de Lima, con el objetivo de identificar la presencia de enterotoxinas estafilocócicas a través de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Mediante el método de la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMSF) se determinó que *Staphylococcus aureus* estaban presentes en 75% de las muestras de quesos, 44% de muestras de embutidos y ausente en cremas chantilly. El 46% de las muestras de queso presentaron recuentos de *S. aureus* mayores a 10^5 UFC/ g.

Mediante la técnica de PCR multiplex para identificación de enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED, SEE, se encontró que el 5% de cepas portaban el gen *sea*, 5% gen *seb*, y el 5% gen *sec*, y el 85% resultaron negativas a algún tipo de enterotoxina clásica, se concluye que los quesos y embutidos comercializados en la ciudad de Lima se encuentran contaminados con *S. aureus* y algunos de ellos con cepas enterotoxigénicas.

Palabras Clave: *Staphylococcus aureus*. Enterotoxinas, PCR multiplex en alimentos, intoxicación alimentaria

SUMMARY

In this study we have isolated *Staphylococcus aureus* in cheese, salami and whipped cream, gathered in the city of Lima, with the aim of identifying the presence of enterotoxins through the technique of the Polymerase Chain Reaction (PCR).

Via the method of the International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) we found that *Staphylococcus aureus* were present in 75% of cheese samples, 44% of sausage samples but absent in whipped cream samples. 46% of cheese samples showed counts of *S. aureus* greater than 10^5 CFU / g.

Using the technique of multiplex PCR for identification of staphylococcal enterotoxins SEA, SEB, SEC, SED, SEE, we found that 5% of the strains were carrying the gene *sea*, 5% were carrying the gene *seb* and 5% were carrying the gene *sec*, and 85% test negative of any classical enterotoxin, we can conclude that cold meats and cheeses sold in Lima are contaminated with *S. aureus* and some with enterotoxigenic strains.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Enterotoxins, PCR multiplex, food poisoning

I.- INTRODUCCIÓN

La contaminación de alimentos por *Staphylococcus* coagulasa positivos enterotoxigénicos representa un problema de salud pública por el riesgo de intoxicación alimentaria. *Staphylococcus aureus* contamina muchos alimentos ya sea durante su procesamiento, almacenamiento o expendio de los mismos. Los síntomas de la intoxicación son dolor abdominal, vómitos, náuseas, diarrea.

Entre las especies coagulasa positivos, *Staphylococcus aureus* es el patógeno más frecuente asociado a intoxicaciones alimentarias debido a que producen varios tipos de enterotoxinas. Otras especies productoras de coagulasa, como *Staphylococcus intermedius* y *Staphylococcus hyicus* también producen enterotoxinas(72)

Staphylococcus aureus es un coco gram positivo, anaerobio facultativo, con moderados requerimientos nutricionales, las cepas suelen ser muy tolerantes a NaCl y así crecer hasta en concentraciones del 10% de NaCl (48)

Cuando *Staphylococcus aureus* se encuentra presente en los alimentos en concentraciones elevadas (10^5 - 10^6 UFC/g) y en condiciones adecuadas de temperatura, pH, actividad de agua y oxígeno producen una o más enterotoxinas en los alimentos, que al ingerirse causan intoxicación alimentaria.(23)

Las enterotoxinas estafilocócicas son proteínas termoestables de bajo peso molecular, hidrosolubles y resistentes a la acción de enzimas digestivas permaneciendo activas después de la ingestión. Las tipos A, B, C₁, C₂, C₃, D, E son las enterotoxinas más frecuentemente aisladas de los alimentos (23)

En los últimos años la metodología para la detección de enterotoxinas estafilocócicas ha mejorado. Hay diversos métodos que se pueden utilizar para detectar enterotoxinas estafilocócicas en los alimentos tales como bioensayos, biología molecular (PCR) y herramientas inmunológicas. (24)

La aplicación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para detectar y caracterizar rápidamente enterotoxinas de *S. aureus* de diferentes alimentos contribuye de sobremanera a mejorar los estudios epidemiológicos de alimentos (25)

El objetivo del presente estudio es detectar enterotoxinas de *S. aureus* aislados de alimentos en la ciudad de Lima, aplicando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La importancia del presente estudio ha sido demostrar que los diversos alimentos que se expenden en los mercados de la Ciudad de Lima de pequeños productores, por condiciones inadecuadas de procesado y/o de conservación (no refrigerados) se contaminan con *Staphylococcus aureus* enterotoxigénicos produciendo intoxicación alimentaria.

II.- GENERALIDADES

II.1. CONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS Y CRECIMIENTO MICROBIANO

La contaminación microbiológica de alimentos causa preocupación en muchos países, debido especialmente a los elevados índices de enfermedades vinculadas por consumo de alimentos crudos, mal preparados y mal conservados. (74)

Los microorganismos son ubicuos en nuestro ambiente y son capaces de colonizar y crecer en los alimentos, pudiéndose encontrar en alimentos ya sean frescos, preparados e incluso algunas veces en los alimentos preservados reduciendo la calidad de los mismos. (48).

Dado que los alimentos son material orgánico, pueden proveer nutrientes para el crecimiento de una amplia variedad de bacterias quimiorganotróficas. Las características físicas y químicas de los alimentos determinan su grado de susceptibilidad a la actividad microbiana (48)

La capacidad de las bacterias para adherirse a las superficies con las que entran en contacto en la industria alimentaria comprometen la higiene y la limpieza de las mismas. Las bacterias se adhieren y multiplican y, eventualmente, dan lugar a la formación de una biopelícula (o “biofilm”) compuesta por bacterias embebidas en una matriz de polímeros extracelulares producidos por ellas mismas. Estas biopelículas sirven de reservorio para la liberación continuada de bacterias a los alimentos procesados en contacto con esas superficies, ya que está comprobado que las bacterias adheridas son más resistentes a los procesos de limpieza e higienización. (19)

II.2 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Staphylococcus aureus (*Staphy*= racimo y *kokkos*=grano) son bacterias en forma de coco, Gram- positivas, no esporuladas, la presentación característica son sus agrupaciones irregulares semejantes a racimos de uvas debido a su capacidad para dividirse en tres planos. Son bacterias aerobias o anaerobias facultativas, inmóviles, son mesófilas, necesitan de aminoácidos y vitaminas para su crecimiento, son capaces de fermentar la glucosa y también el manitol, toleran condiciones ambientales muy variables: son osmotolerantes, resistiendo concentraciones hasta un 20% de NaCl, lo que le permite crecer en alimentos con baja actividad de agua (desde 0.99 hasta 0.83 aw). Son además resistentes a la desecación, congelación y el calor (48).

Staphylococcus aureus se encuentra en los humanos en la mucosa de la nasofaringe donde la bacteria existe como flora normal transitoria o permanente desde donde pasa a otras zonas como la orofaringe, piel, glándulas mamarias, vías respiratorias altas, intestino. *S. aureus* también se encuentra en reservorios animales, principalmente en el ganado y aves de corral; en animales productores de leche origina mastitis o infección de las glándulas mamarias, de esta manera pueden contaminar la leche y derivados lácteos, convirtiéndose en posible fuente de intoxicación alimentaria (29)

Los *Staphylococcus aureus* poseen una pared celular formada por un 50% de mureína de su peso seco. La mureína es un péptidoglucano compuesto de subunidades alternas de los polisacáridos ácido N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico con enlaces β 1, 4. Estas cadenas de polisacáridos tienen, a su vez, enlaces cruzados por cadenas de tetrapéptidos unidas al ácido N-acetilmurámico y por un puente de pentaglicina específico para *S. aureus*. Otros componentes importantes de la pared celular del estafilococo son los ácidos teicoicos con ribitol, unidos covalentemente al péptidoglucano. El ácido lipoteicoico es un polímero de

glicerol y fosfato unido al glicolípido terminal anclado a la membrana citoplasmática. (37, 49). Además, la pared del *S. aureus* posee muchas proteínas de superficie: La proteína A; es el prototipo de estas proteínas, y tiene propiedades antifagocíticas que están basadas en su capacidad de unión a la porción Fc de las inmunoglobulinas. (37, 48)

S. aureus es un patógeno extraordinariamente versátil causante de un amplio espectro de infecciones que comprenden desde lesiones superficiales a infecciones sistémicas en algunos casos hasta peligrosas para la vida. Además *S. aureus* es responsable de enfermedades mediadas por toxinas, tales como el síndrome de shock tóxico (SST) e intoxicación alimentaria estafilocócica. (48, 49)

El *Staphylococcus aureus* produce una amplia gama de determinantes de virulencia, que abarca a los componentes de la pared celular y una gran variedad de exoproteínas con acción enzimática y/o tóxica, que contribuyen en su habilidad para colonizar y de causar enfermedad en huéspedes mamíferos. (49). Estas exoproteínas incluyen proteasas, lipasas, lecitinasas hialuronidasas, coagulasa ligada, coagulasa libre y termonucleasas (DNasa). La principal función de estas proteínas sería convertir tejidos del huésped en nutrientes requeridos para el crecimiento bacteriano. (23). La coagulasa, que provoca la conversión del fibrinógeno en fibrina que forma los coágulos, es el factor de patogenicidad más importante de *S. aureus*. Los coágulos inducidos por la coagulasa dan lugar a la acumulación de fibrina alrededor de las bacterias protegiéndolas fundamentalmente frente a la fagocitosis (28, 48)

Algunas cepas de *S. aureus* producen una o más exoproteínas adicionales, que incluyen a la Toxinas del síndrome del Shock tóxico 1 (TSST-1), las enterotoxinas estafilocócicas (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER y SEU), las toxinas exfoliativas (ETA y ETB), y las leucocidinas. De cada una de estas toxinas se conoce que estimulan la respuesta del sistema inmune del huésped, pero además ellas tienen otros efectos biológicos (23).

II.3 INTOXICACIÓN ALIMENTARIA POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

La intoxicación alimentaria es la enfermedad que resulta de la ingestión de alimentos que contienen toxinas generadas por microorganismos. Los microorganismos que producen estas toxinas no crecen en el huésped y generalmente no están viables en el momento de ingerir los alimentos. La enfermedad es debida a la ingestión y acción de la toxina activa. (48)

En muchos países el *Staphylococcus aureus* es considerado el segundo o tercer patógeno más comúnmente involucrado en intoxicación alimentaria, sólo es excedido en número por *Salmonella spp.* (4)

La intoxicación alimentaria resulta de la ingestión de una o más enterotoxinas preformadas en el alimento que se ha contaminado con *S. aureus*, la intoxicación estafilocócica es una condición auto-limitada que se resuelve dentro de 24 a 48 h del inicio. El cuadro clínico se caracteriza por la presencia de vómitos y diarrea. El período de incubación es corto, entre una a seis horas. (23).

Los anticuerpos producidos después de la enfermedad no confieren necesariamente inmunidad a la intoxicación alimentaría estafilocócica, porque diferentes tipos de enterorotoxinas son capaces de producir enfermedad (23).

La intoxicación alimentaria estafilococica resulta del consumo de alimentos en los que *S. aureus* se ha multiplicado por encima de 10^5 ufc/gr y producido enterotoxinas (28)

De acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud (ONMS), los manipuladores de alimentos son responsables directa o indirectamente por alrededor de 26% de los casos de enfermedades bacterianas causadas por alimentos (19)

II.4 ENTEROTOXINAS ESTAFILOCOCICAS

Las enterotoxinas estafilocócicas constituyen un grupo de proteínas extracelulares de cadenas simples, con bajo peso molecular (26 a 30kDa). Las enterotoxinas están constituidas fundamentalmente por estructuras beta, adoptan una disposición de relativa soltura en la que una buena parte de su superficie queda expuesta al medio acuoso del organismo permitiendo así su interacción con otras moléculas. Son ricas en aminoácidos lisina, ácido aspártico, ácido glutámico y residuos de tirosina. La mayoría poseen residuos disulfuro (cistina) dentro del dominio terminal NH₂ que está implicado en las propiedades eméticas (28)

Son hidrosolubles y resistentes a la acción de enzimas proteolíticas del sistema digestivo como la pepsina y tripsina, permaneciendo activa después de la ingestión. (46). En general, los tratamientos térmicos utilizados en la elaboración de alimentos no son eficaces para la destrucción completa de la enterotoxina estafilocócica, la estabilidad térmica de la enterotoxina estafilocócica es influenciado por la naturaleza de los alimentos, el pH, la presencia de NaCl y el tipo de toxina. Por ejemplo La enterotoxina estafilocócica A (SEA) es relativamente más estable al calor a pH de 6.0 a más, en cambio la enterotoxina estafilocócica D (SED) es relativamente más estable a pH de 4,5 a 5,5 (23).

Las enterotoxinas son nominadas con letras del alfabeto de acuerdo con el orden cronológico como fueron descubiertas; por ejemplo SEA, SEB, SEC, SED, SEE, etc., se las diferencia una de otra por características antigénicas (14). Los diferentes tipos de enterotoxinas de *S. aureus* han sido distinguidos serológicamente, bioquímicamente, y por análisis genético. Hasta la actualidad han sido descritos 18 tipos de enterotoxinas distintas, las cuales comparten algunas semejanzas en la estructura y secuencia de aminoácidos (15). Las toxinas bien reconocidas, del SEA al SEE, entran en dos grupos: SEB, SEC₁, SEC₂, y SEC₃ que tiene un 66 a 98% idéntica la sucesión de aminoácidos y SEA, SED, y SEE, son idénticos en la

sucesión de aminoácidos en un 53 a 81%, en general las toxinas son estructuralmente muy similares (72).

Las enterotoxinas están codificadas por elementos móviles genéticos, como plásmidos, bacteriófagos o islas de patogenicidad, que facilitan la diseminación horizontal entre poblaciones bacterianas (23, 28)

Las enterotoxinas de *S. aureus* pertenecen a la familia de los superantígenos asociados a las intoxicaciones alimentarias, los superantígenos, no actúan directamente sobre las células, pero producen una estimulación general del sistema inmune del hospedador para que produzca daño en el mismo. (48). Los superantígenos se unen a dos receptores del sistema inmune: algunas regiones de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) de las células presentadoras de antígenos (macrófagos) y concomitantemente se unen a la región variable de las cadenas β de los linfocitos T colaboradores. Esta interacción da lugar a una estimulación masiva (proliferación policlonal) de linfocitos T (V β -TcR), estas producen grandes cantidades de citocinas tipo interleucina 2 (IL-2) que al llegar al torrente circulatorio producen una variedad de síntomas como náuseas, vómitos y fiebre (23, 29).

Es difícil establecer la dosis infectiva pues varios parámetros pueden afectar la producción de la enterotoxina. La *Scientific Committee on Veterinary measures relating to public health on staphylococcal enterotoxins in milk products, particularly cheeses* (72) citan investigaciones con diferentes dosis infecciosas para producir intoxicación alimentaria: 0,2 ug kg de peso corporal humano, otros mencionan que es necesario ingerir 10-20 microgramos de SE para obtener síntomas, Otros autores estiman que menos de 1 microgramos de SE puede causar síntomas de envenenamiento de alimentos en individuos sensibles. Por lo que se puede decir que hasta la actualidad, no se dispone de datos adicionales para sugerir una dosis tóxica. (72)

II.5 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETECCIÓN DE ENTEROTOXINAS

Independientemente del área en que actúan, los microbiólogos están siempre interesados en nuevos métodos analíticos para la cuantificación e identificación de microorganismos y o de sus productos metabólicos (11, 16).

Tradicionalmente, las infecciones se diagnosticaban mediante el cultivo de muestras de alimentos que se suponen contaminados y la identificación de las bacterias que crecen en medios de cultivo, en base a criterios morfológicos y fisiológicos que quizá dependan de factores ambientales o genéticos. Además, la obtención de resultados puede tomar días o semanas (11)

Para el recuento de *Staphylococcus aureus* se han propuesto diversos métodos específicos, por ejemplo el medio de Baird Parker, el cual presenta las ventajas siguientes: a) selectividad b) no inhibición de los estafilococos estresados c) facilidad de reconocimiento de las colonias de *S. aureus*. Es un medio recomendado por la International Organization for Standardization y por el United States Department of Agriculture para el recuento de *S. aureus* de carne y productos cárnicos. (39)

Antiguamente para la detección de las enterotoxinas estafilocócicas se inyectaba por vía intraperitoneal o endovenosa el cultivo o el extracto del alimento en gatos y gatitos y su administración por vía oral a monos rhesus, estos procedimientos por no ser prácticos y su elevado costo fueron sustituidos totalmente por métodos serológicos (39)

Para la detección serológica y cuantificación de las enterotoxinas se han empleado variaciones de diversos métodos que utilizan anticuerpos específicos: La técnica de anticuerpos fluorescentes, la técnica de inhibición de la hemoaglutinación,

la técnica de doble difusión en portaobjetos, la técnica de hemoaglutinación pasiva inversa y la técnica de radioinmunoensayo (14, 39, 72).

Entre las técnicas de radioinmunoensayo más comúnmente utilizada es la aglutinación de látex pasiva (RPLA). El RPLA es un método que tiene varias ventajas en la actualidad, incluyendo (i) alta especificidad y sensibilidad, (ii) simplicidad (no hay necesidad de procedimientos complicados o costosos equipos) y (iii) economía. La desventaja de la prueba es el tiempo que requiere (alrededor de 16 horas de incubación). (31). Aunque se puede reducir el tiempo a 3 horas usando partículas de látex de alta densidad (8). Con esta prueba se han reportado reacciones cruzadas entre SEB y el SECs y entre el SEA y SEE (los equipos son generalmente deficientes en el anticuerpo específico para la enterotoxina E, las cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de Enterotoxina E serían clasificadas como productoras de Enterotoxina A. El RPLA también depende de las cantidades suficientes de toxina que se produce en ausencia de los productos bacterianos que interfieren para la detección exitosa. (72)

Los sistemas de tipificación molecular constituyen una de los aportes microbiológicos que más difusión han tenido en los últimos años. El desarrollo y la automatización de los métodos de PCR abren una gran oportunidad para su aplicación como herramientas analíticas en microbiología y control de calidad de los alimentos, debido a su rapidez, alta sensibilidad y eficiencia para la detección temprana de los patógenos. (27)

II.6 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La utilización de métodos de Biología Molecular es un gran apoyo para obtener diagnósticos sensibles y específicos en el menor tiempo posible (54).

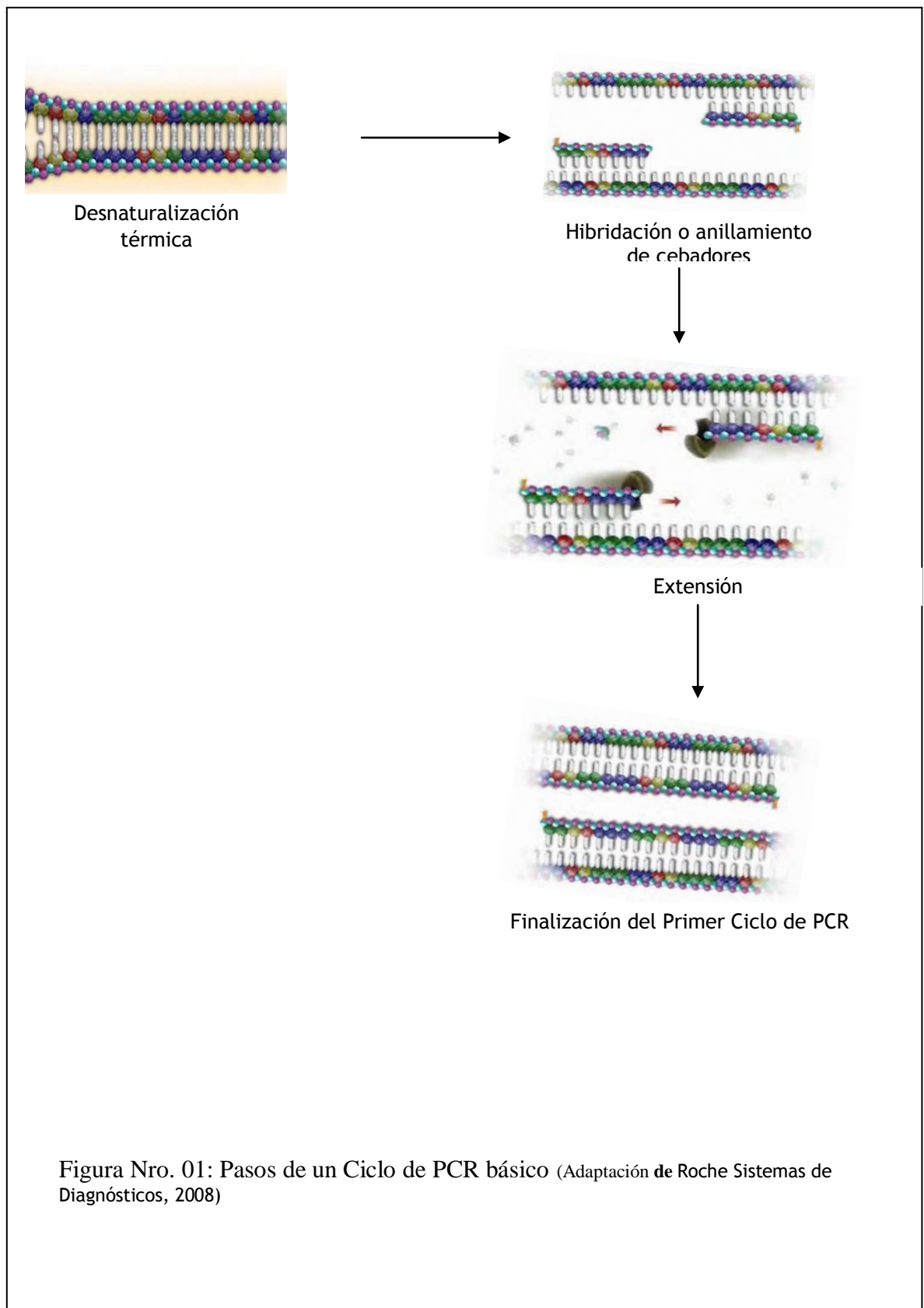
La técnica llamada **Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)** inventada por Kary Mullis a mediados de la década de 1980, es una nueva técnica que se emplea para amplificar fragmentos específicos de ADN sin la necesidad de células bacterianas, tomando como base el mecanismo de replicación *in vivo* del ADN (41).

La reacción consiste en la amplificación o replicación enzimática *in vitro* de un fragmento de ADN, pudiendo llegar a copiarse 10^6 veces para lo que es necesario lo siguiente: (54)

- El ADN molde que se desea amplificar
- Un ADN polimerasa termorresistente (taq polimerasa)
- Cebadores de secuencia específica (10 y 20 pares de nucleótidos complementarios a una región de la secuencia a amplificar)
- Nucleótidos para la síntesis de nuevo ADN (desoxirribonucleótido trifosfato, dNTPs)
- Tampón de reacción (que incluye las distintas sales requeridas por la enzima)

Los protocolos básicos de PCR constan de los siguientes pasos fundamentales: (54)

1. Desnaturalización térmica del ADN que se va a usar como molde.
2. A una temperatura menor que la de desnaturalización, anillamiento de cebadores sintéticos cuya secuencia les permite hibridar uno a cada lado de la secuencia diana.
3. Extensión por parte de la ADN polimerasa de los oligonucleótidos anillados que actúan como cebadores.
4. Este proceso de tres pasos es entonces repetido un número determinado de veces (25-35), duplicándose cada vez el número de moléculas de producto.



En el procedimiento básico del PCR, la muestra de ADN se mezcla con una alícuota de polimerasa Taq y los cuatro desoxirribonucleótidos, junto con un gran exceso de dos fragmentos sintéticos cortos de ADN (oligonucleótidos) que son complementarios de las secuencias de ADN en los extremos 3' de la región del ADN que va a amplificarse. Los oligonucleótidos o *primers* sirven como cebadores a los que se agregan los nucleótidos durante los pasos siguientes de replicación. Luego la mezcla se calienta a unos 93°C, que es lo bastante caliente para hacer que las moléculas de ADN de la muestra se separen en sus dos cadenas componentes. A continuación la mezcla se enfría a unos 60°C para permitir que los cebadores se unan a las cadenas de ADN blanco y la temperatura se eleva a 72° C para que la polimerasa termofílica agregue nucleótidos al extremo 3' de los cebadores (41). De esta manera, la reacción permite obtener una gran sensibilidad al detectar muy baja cantidad de ADN molde y especificidad al detectar únicamente la secuencia de ácido nucleico para la que han sido diseñados los cebadores.

En el resultado final del PCR influyen muchos factores tales como: (76)

- Diseño apropiado de los cebadores
- Calidad y concentración del ADN
- Concentración del Magnesio
- Tipo y calidad de la Tap polimerasa
- Programa de amplificación.

Los protocolos de PCR pueden ser de dos tipos: (29)

- PCR simple: Se rastrea o busca un solo gen o secuencia de ADN en la reacción
- PCR multiple: Se buscan varios genes utilizando varios pares de iniciadores en una misma reacción

Dentro de las ventajas de la técnica de PCR cabe resaltar su alto grado de especificidad, en la detección de enterotoxinas los primers se han diseñado tomando en cuenta el alto grado de homogeneidad que existe entre genes de las diferentes enterotoxinas (76)

II.6.1 PCR MULTIPLEX

Son reacciones que consiguen amplificar simultáneamente y en un único tubo diferentes secuencias diana, permitiendo la detección e identificación simultánea de distintos genes de interés (54)

Sharma *et al*, 2000 (73), realizaron el desarrollo de un ensayo que tipifica las toxinas de cepas de *Staphylococcus aureus* usando el múltiplex PCR de una sola reacción. En este estudio, se divulga el desarrollo de un rápido ensayo de múltiplex PCR (3 a 4 h), que detecta específicamente los genes para las enterotoxinas estafilocócicas de la A a E en cepas de *S aureus* toxigénicos (73).

Esta reacción de PCR aprovecha las regiones conservadas y únicas de los genes de la toxina y utiliza un primer universal sentido con los primers reversos específicos para el gen de cada una de las toxinas. La plantilla de DNA fue extraída de cepas de *Staphylococcus aureus* (73)

En los últimos años se han desarrollado varios protocolos de PCR multiplex que permite la detección rápida, específica y especialmente simultánea de toxinas estafilocócicas (8, 21, 32, 66, 69, 73)

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1. TIPO DE ESTUDIO:

Longitudinal, prospectivo, descriptivo y analítico.

III.2. LUGAR DE EJECUCIÓN:

El trabajo de investigación fue realizado en los siguientes Laboratorios:

- Laboratorio de Microbiología “Dr. Simón Pérez Alva” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica-UNMSM.
- Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina - UNMSM
- Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional del Callao (UNAC)

III.3 MATERIALES

III.3.1 MUESTRAS

100 muestras de quesos, cremas y embutidos adquiridas en puestos de venta ambulatoria de mercados de distritos populosos de la Ciudad de Lima.

Se analizó un total de 60 muestras de quesos frescos, 30 muestras de embutidos (jamonada, hot-dog, chorizo, salchicha, pastel de jamón), 10 muestras de cremas chantilli.

Las muestras de quesos fueron adquiridas en el mercado de Caquetá (quesos de procedencia de Canta, Huarochirí), las muestras de embutidos en el mercado de Caquetá y el mercado Central de Lima y las cremas chantilly de tortas de

panaderías del centro de Lima y de Caquetá, algunos de los cuales contaban con vitrinas de refrigeración para la venta de sus productos.

III.3.2 EQUIPOS Y REACTIVOS

Medios de cultivo:

- Agar Baird Parker con yema de huevo y telurito de potasio
- Agar Infusión Cerebro Corazón
- Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI)
- Agar Tripticasa Soya
- Agar azul de Toluidina
- Agua peptonada
- Agua citratada

Reactivos e insumos

- Plasma de conejo
- Tips con filtros estériles (10ul, 200ul, 1ul)
- Tubos de microcentrifugas x 1.5 ml.
- Tubos para PCR de 0.2 ml.
- Oligonucleótidos iniciadores o primers
- desoxirribonucleotidos trifosfato (dNTPs)
- Buffer de reacción 10X
- Buffer TE 10X
- Taq ADN polimerasa
- Tris HCl
- KCl
- Acetato de amonio 7.5 M
- Etanol 70%

- Lisostafina
- Reactivo GES (Guanidina, EDTA, Sarcosyl)
- Fenol- Cloroformo
- Isopropanol
- Agua bidestilada estéril
- Buffer Electroforesis TBE 1X
- Bromuro de Etidio
- Agarosa Grado Biología Molecular
- Marcadores de peso molecular de ADN , Ladder de 100pb
- Guantes
- Mascarilla
- Solución salina fisiológica

Equipos:

- Termociclador Applied Biosystem
- Potenciómetro marca HANNA
- Microcentrifuga refrigerada SIGMA
- Cámara de Electroforesis horizontal
- Espectrofotómetro UV/VIS
- Transiluminador ultravioleta
- Congelador 4° C y -20°C
- Baño María
- Vortex
- Micropipetas P₁₀, P₅₀, P₂₀₀
- Balanza
- Incubadora
- Autoclave
- Licuadora

III.4 METODOLOGIA DE TRABAJO

La metodología seguida para los análisis microbiológicos de las muestras, es la recomendada por la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas de Alimentos ICMSF (1999) (39, 40).

Se aplicó el protocolo de PCR de *Naresh K. Sharma et al* (2000) (73) que consiste en la detección de genes de enterotoxinas estafilocócicas (A, B, C, D, y E) por test de Múltiplex PCR.

III.4.1 Aislamiento de *Staphylococcus aureus* :

Preparación y dilución de los homogenizados de alimentos (ICMSF, 40)

- Desinfectar la superficie externa del envoltorio externo con alcohol de 70°
- Seccionar y pesar 10 gr. de muestra de alimento a analizar.
- En condiciones de esterilidad , añadir la muestra a una licuadora estéril conteniendo 90 ml. de agua peptonada (embutidos y carnes o 90ml. de agua citratada (quesos) y homogenizar (dilución 10^{-1})
- Seguir diluyendo hasta 10^{-5} en tubos con 9ml. de agua peptonada o agua citratada según tipo de muestra.

Recuento de *Staphylococcus aureus* : Método de siembra directa en placas de agar Baird Parker (ICMSF, 40)

- Se prepararon diluciones de las muestras de alimentos.
- Se preparó el agar de Baird –Parker en placas petri a razón de 15 ml. a cada una y se dejó solidificar y secar.

- ✧ Se sembraron 0.1 ml. de homogenizado y de sus diluciones en la superficie del medio contenido en placas independientes y se extendió el inóculo con ayuda de espátulas de vidrio
- ✧ Se incubaron las placas a 37°C durante 30 a 48 hrs.
- ✧ Pasado el tiempo de incubación, se eligieron placas que contenían entre 20 y 200 colonias aisladas y se contaron todas las colonias negras y brillantes de margen estrecho y blanco rodeadas de áreas claras que se extienden en el medio opaco.
- ✧ Se seleccionaron las colonias sospechosas de *S. aureus* y se realizó la prueba de coagulasa

III.4.2 Prueba de Coagulasa (ICMSF, 40)

- ✧ Las colonias sospechosas de ser estafilococos coagulasa positivo se sembraron en caldo BHI (Brain Heart infusión) y se incubaron durante 18 a 24 horas a 35-37°C.
- ✧ Pasado el tiempo de incubación, es transferido 0.1 ml. de cultivo a tubos de 10x 75mm conteniendo 0.3ml. de plasma de conejo y se incubaron en Baño María 35- 37° C.
- ✧ Se observaron la formación de coágulos en el intervalo de 4 horas
- ✧ La formación de coágulos fueron observada a diferentes intensidades (1+, 2+, 3+, 4+).
- ✧ La formación de coágulo de cualquier intensidad indicó un resultado positivo

III.4.3 Prueba de Termonucleasa (*ICMSF(40)*)

- Se prepararon placas con Agar Azul de Toluidina DNA (TDA)
- Luego se practicaron excavaciones de 2 mm. de diámetro en el agar utilizando una varilla de vidrio hueca y se retiraron los trozos de agar por aspiración.
- Se adicionó en cada excavación aproximadamente 0.1 ml. de caldos de cultivo preparados para la prueba de coagulasa, previamente calentadas en baño de agua hirviente durante 15 minutos
- Se incubaron las placas durante 4 horas a 35-37°C.
- La aparición de un halo rosado brillante que se extiende por lo menos hasta 1 mm. del borde de la excavación fue considerada positiva

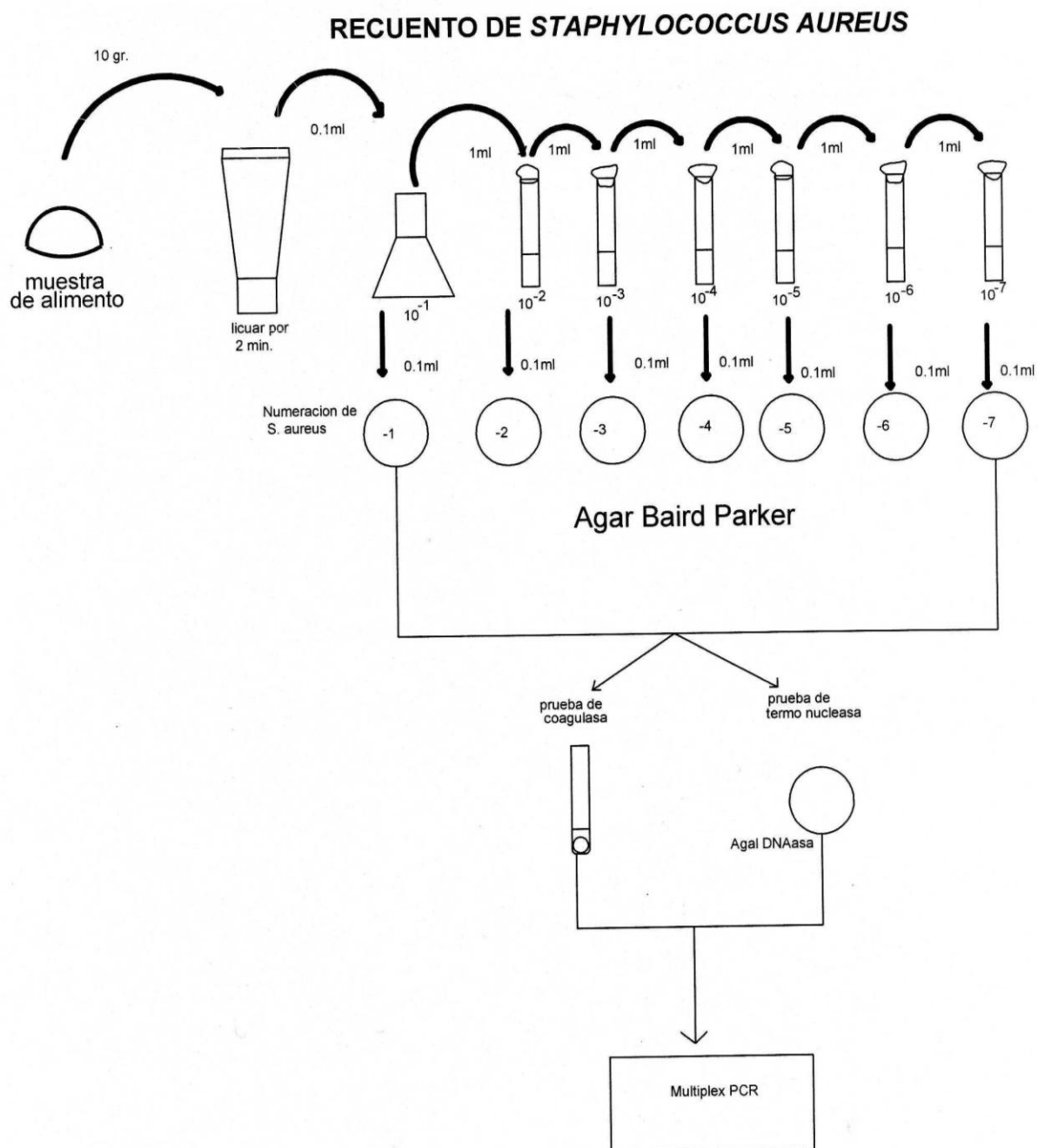


Figura N° 02: Aislamiento y Recuento de *Staphylococcus aureus* de alimentos

III.4.4 TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA : PCR MULTIPLEX

III.4.4.1 Extracción del DNA: Se utilizó el método modificado de extracción con Guanidina. (Persing, Smith) (67)

- Se inoculó las cepas de los *Staphylococcus aureus* seleccionados en 5 ml de BHI caldo y se incubó por 18 horas-24 horas.
- Se colectó células de los caldos de cultivo, por centrifugación de 500 ul. del cultivo de 18-24hr de incubación de *Staphylococcus aureus* a 13,000 rpm durante 4 min.
- Se resuspendió el sedimento “pellet” en 100 ul de buffer TE y se lavo dos veces, centrifugando cada vez a 13,000 rpm x 4 min.
- Luego se resuspendió el “pellet” en 100 ul de buffer TE 1X conteniendo 50 ug de lisostaphin por ml, se incubó la mezcla por 30 min a 37 °C.
- Se adicionó 500 ul de reactivo GES (Guanidina, EDTA, Sarcosyl) y se invirtió los tubos hasta observar lisis celular por 5 min.
- Luego los tubos se enfriaron sobre hielo por 5 min, y se adicionó 250 ul de acetato de amonio 7.5 M helado, se mezcló por agitación cuidadosa hasta observar dos fases, se enfrió las muestras sobre hielo por 10 min.
- Seguidamente se adicionó 0.5 ml de fenol-cloroformo (24:1), se mezcló las fases cuidadosamente por agitación vigorosa manual sin utilizar vortex.

- Se centrifugó por 10 min a 13,000 rpm y luego se transfirió cuidadosamente la fase acuosa a un nuevo vial de 1.5 ml usando una pipeta Pasteur.
- A la fase acuosa se le adicionó 459 ul de isopropanol frío (-20 °C), se invirtió el tubo hasta la precipitación del ADN.
- Se centrifugó a 13,000 rpm x 4 min, se aspiró la fase acuosa con mucho cuidado para no aspirar el sedimento.
- El sedimento (ADN) se lavó con 500 ul de etanol al 70% y se centrifugó a 13,000 rpm x 4 min y nuevamente se aspiró la fase acuosa, se repitió este paso por 3 veces.
- El sedimento obtenido se llevó a desecar por 20 a 30 min a 37° C.
- Finalmente el sedimento (ADN extraído) se disolvió en 100 ul de agua bidestilada estéril durante toda la noche a temperatura ambiente y luego se conservó a 4° C

III.4.4.2 PCR Multiplex para la detección de genes de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus*, (73)

Para el PCR Multiplex se seleccionaron en 20 cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de **quesos**, que tuvieron reacción positiva a la termonucleasa.

- La Reacción de PCR Multiplex fue desarrollada en un tampón de reacción constituido por 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 4 mM MgCl₂, 0.01% gelatina en un volumen total de 50 µl, conteniendo 1 µl (- 1 ng) de ADN y de 20 a 30 pmol de cada primers SA-U, SA-A, SA-B, SA-C, SA-D y SA-E, ENT-C y 0.2 mM de cada desoxirribonucleotidos trifosfato (dATP, dTTP, dGTP, y dCIP), además se adicionó al mix de reacción 1.0 U de Taq polimerasa.
- Las condiciones de amplificación consistieron de una Desnaturalización inicial a 94° C por 5 minutos y 25 ciclos constituidos a su vez de una desnaturalización de 30 segundos nuevamente a 94° C, alineamiento de los imprimadores(hibridación) a 50° C por 30 segundos y la extensión a 72° C por 30 segundos. Finalmente un último ciclo de 2 minutos a 72 ° C.
- Los amplicones fueron conservados a -20° C hasta ser analizados.
- La detección de ADN amplificado se realizó por electroforesis: Alícuotas de 7 µl de amplicones fueron analizadas en un gel de agarosa al 2.5 % en amortiguador TBE 1X por electroforesis en cámara horizontal a 80 V por 1 hora y luego revelado con bromuro de etidio 0.5 µg/ml. El gel fue luego observado en el transiluminador UV y fotografiados por cámara digital. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 bp.
- Se utilizó como control negativo la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

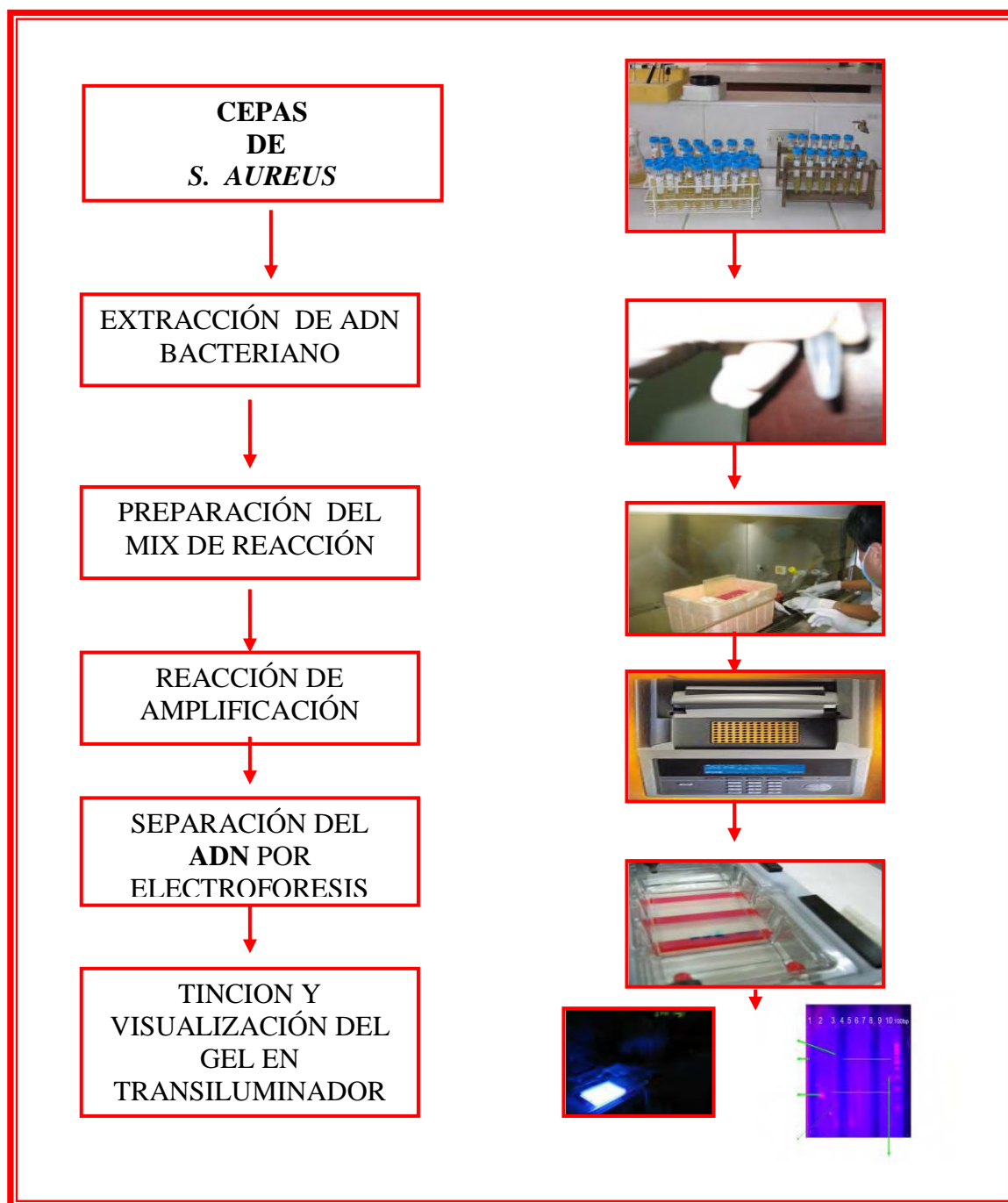


Figura N° 03. Pasos básicos del Protocolo de PCR multiplex utilizado para detección de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* de alimentos

TABLA N°. 01 Primers y Programas de amplificación PCR de los genes de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus*. (73)

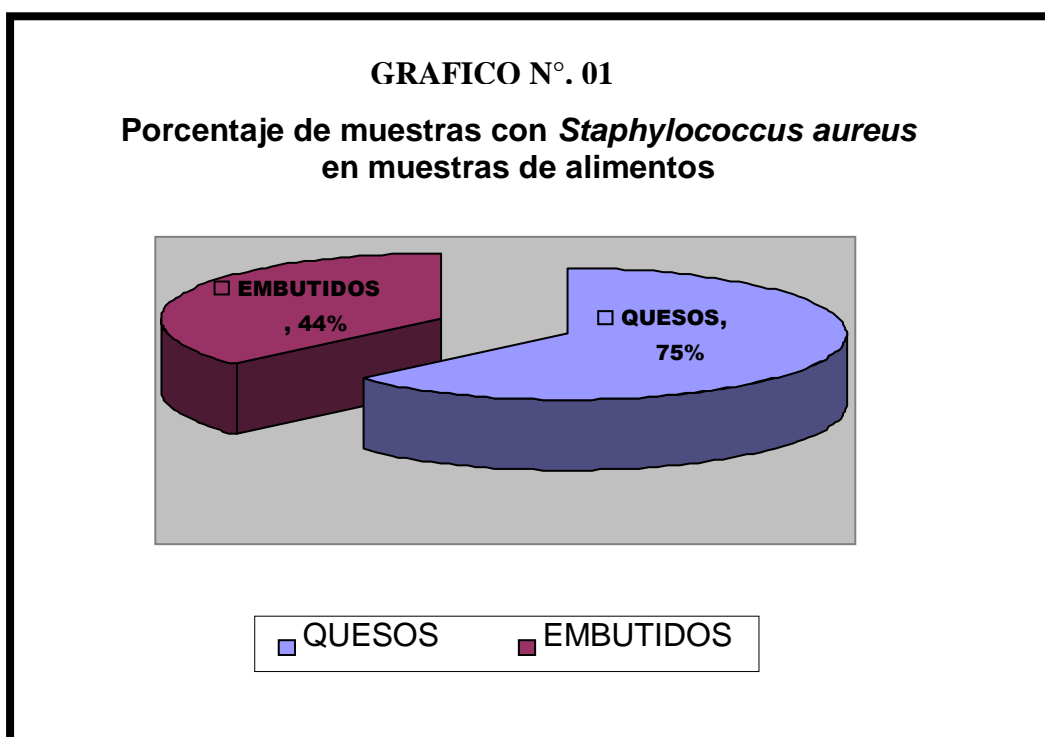
Nombre y tamaño del Primer (nt)*	Descripción	Secuencia de los Nucleótidos (5'-3')	localización de el Gen	Tamaño(pb)* del producto PCR
SA-U (20)	Primer Universal sentido	5'-TGTATGTATGGAGGTGTAAC-3'	—	
SA-A (18)	Primer reverso para <i>sea</i>	5'-ATTAACCGAAGGTTCTGT-3'	639–657	270
SA-B (18)	Primer reverso para <i>seb</i>	5'-ATAGTGACGAGTTAGGTA-3'	564–582	165
SA-C (20)	Primer reverso para <i>sec</i>	5'-AAGTACATTTTGTAAGTTCC-3'	457–477	69
ENT-C (25)	Primer reverso para <i>sec</i>	5'- AATTGTGTTTCTTTTATTTTCATAA- 3'	485–510	102
SA-D (20)	Primer reverso para <i>sed</i>	5'-TTCGGGAAAATCACCTTAA-3'	676–696	306
SA-E (16)	Primer reverso para <i>see</i>	5'-GCCAAAGCTGTCTGAG-3'	584–600	213

(pb)*= Pares de bases

(nt)^x= nucleótidos

IV. RESULTADOS

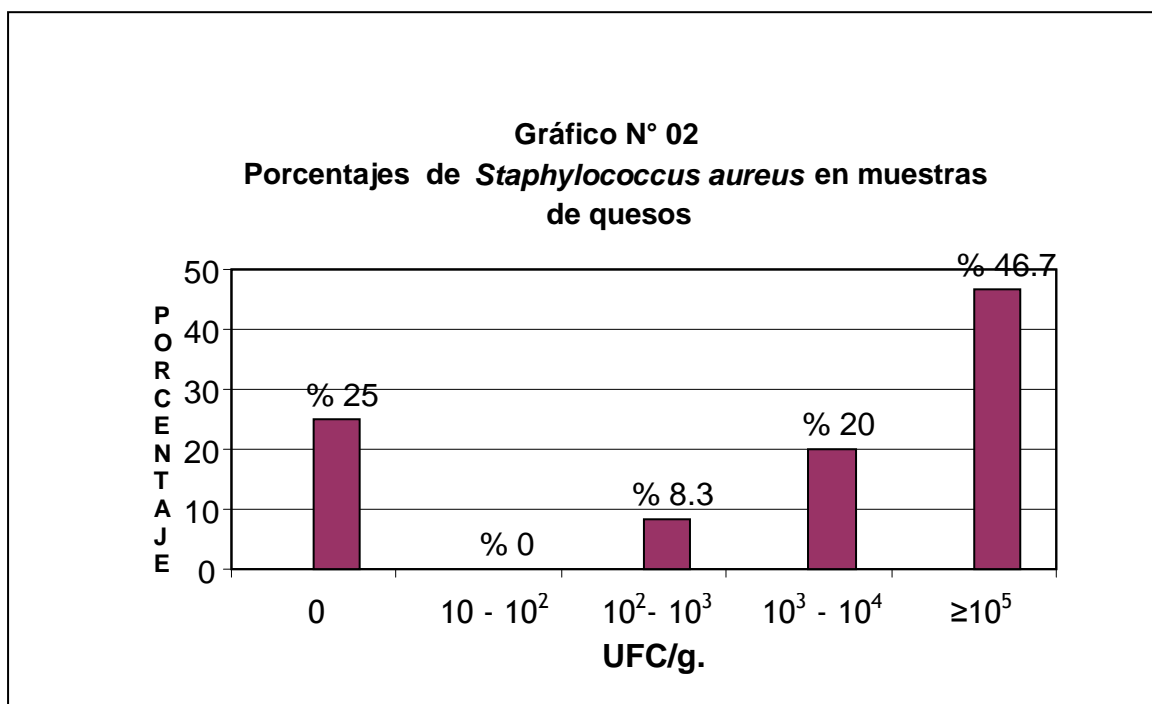
De las muestras analizadas: 60 de queso, 30 de embutidos y 10 de cremas, se aisló *S. aureus* en 45 muestras de quesos (75%), 13 de embutidos (44%) y no se aisló en cremas (Gráfico N° 01)



De las 45 muestras de queso con *S. aureus*, 28 (46,7%) de ellas tenían recuentos mayores a 10^5 UFC/ gr (Tabla N° 02. Gráfico N° 02)

Tabla N° 02: Recuentos de *Staphylococcus aureus* en muestras de quesos frescos

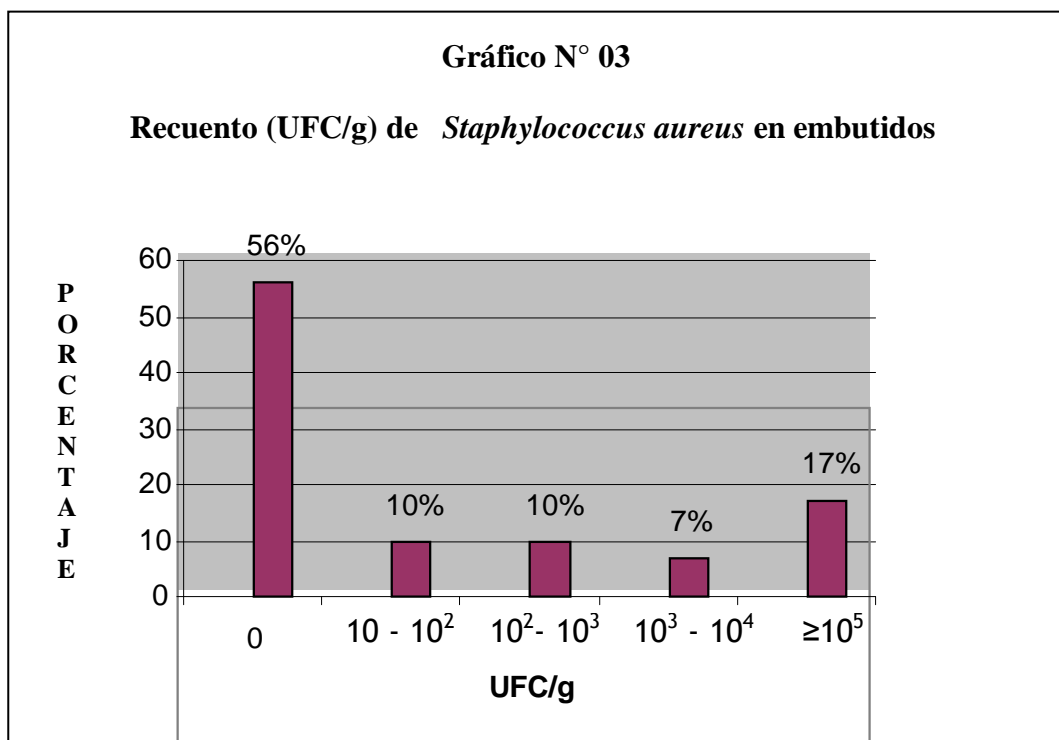
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/gr)	<i>n</i>	%
0	15	25
$10 - 10^2$	0	0
$10^2 - 10^3$	5	8.3
$10^3 - 10^4$	12	20
$\geq 10^5$	28	46.7
TOTAL	60	100



De las 30 muestras de Embutidos analizadas, en 13 (44%) de ellas se encontraron *S. aureus*. Las muestras de Hot-dog fueron negativas, las muestras de chorizo tuvieron los mayores grados de contaminación, habiéndose encontrado que el 17% de las muestras analizadas presentaron recuentos mayores a de 10^5 UFC/g. (Tabla N° 03) (Gráfico N°03)

TABLA N° 03: Recuento de *Staphylococcus aureus* en muestras de embutidos

<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	<i>n</i>	%
0	17	56
$10^0 - 10^2$	3	10
$10^2 - 10^3$	3	10
$10^3 - 10^4$	2	7
$\geq 10^5$	5	17
TOTAL	30	100.



Las 10 muestras de cremas analizadas no presentaron crecimiento de *Staphylococcus aureus* (Tabla N° 04)

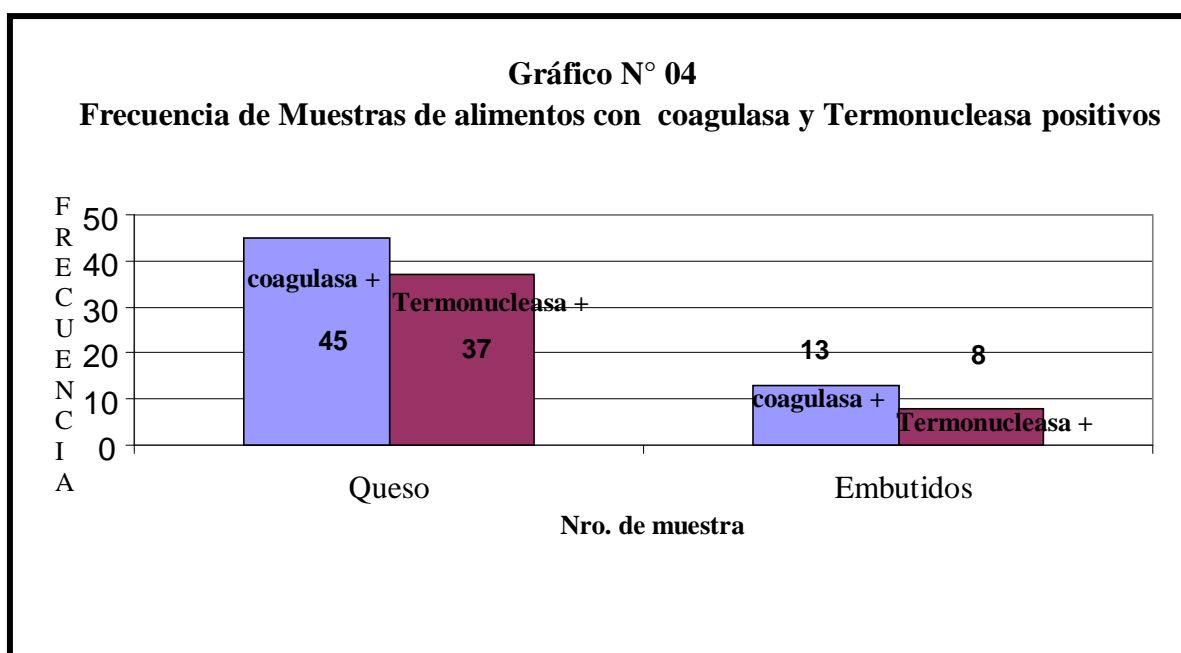
TABLA N° 04: RECUENTO DE *S. AUREUS* EN MUESTRAS DE CREMAS

Muestra	Tipo de embutido	Staphylococcus aureus UFC/g
1	crema chantilli	Ausente
2	crema chantilli	Ausente
3	crema chantilli	Ausente
4	crema chantilli	Ausente
5	crema chantilli	Ausente
6	crema chantilli	Ausente
7	crema chantilli	Ausente
8	crema chantilli	Ausente
9	crema chantilli	Ausente
10	crema chantilli	Ausente

La prueba de termonucleasa se realizó en todas las cepas positivas a *Staphylococcus aureus* (reacción positiva a coagulasa) y es así que de las **45 muestras de queso** que presentaron *Staphylococcus aureus*, **37** de ellas (82%) fueron también positivas a la producción de la termonucleasa. De las **13 muestras de embutidos** que presentaron *Staphylococcus aureus*, **solo 8** (62%) tuvieron un resultado positivo a la prueba de termonucleasa. (Tabla N° 05) (Gráfico N° 04)

Tabla N° 05. Frecuencia de muestras coagulasa positivas con prueba de termonucleasa positiva

Muestras coagulasa positivos (n) <i>(Staphylococcus aureus)</i>	Reacción positiva a la Termonucleasa
Queso (45)	37
Embutidos (13)	8
Cremas (0)	0



Se seleccionaron 20 cepas aisladas de quesos con reacción positiva a la termonucleasa para la detección de genes responsables de la producción de las enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED, SEE aplicando la el PCR multiplex de las cuales en 3 muestras (15%), se identificaron uno de los genes de enterotoxinas *sea*, *seb*, *sec*, respectivamente (Figura N°04, Grafico N° 05).

Tabla N°. 06. Presencia de genes de Enterotoxinas de *S. aureus* aislados de quesos

Genes de enterotoxinas detectada	N
<i>sea</i>	1
<i>seb</i>	1
<i>sec</i>	1
negativas	17
Total	20

Ningún *S. aureus* aislado de quesos presentaron más de un gen de las enterotoxinas buscadas, y el 85% de ella fueron negativas para algún tipo de gen enterotoxigénicos

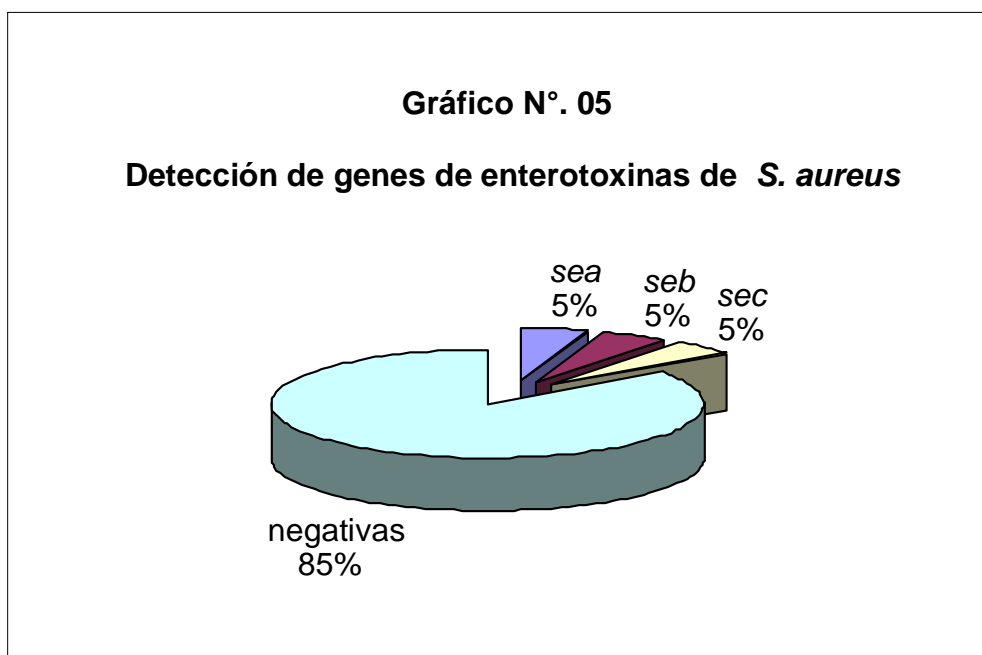
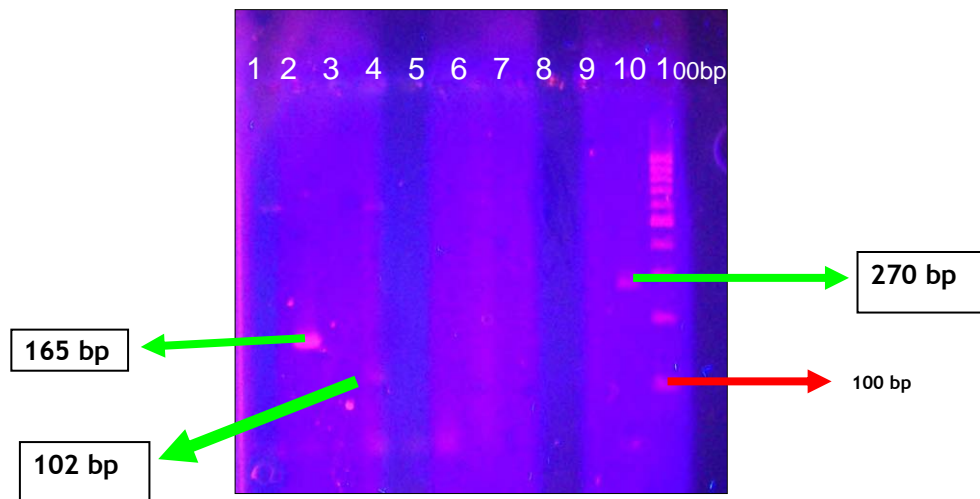


Figura N°. 04 Análisis del gel de electroforesis del Multiplex PCR para la detección de genes de enterotoxinas.



Línea 1: Control negativo (mix+ agua),
Línea 2: *seb* (165pb),
Línea 3: negativo,
Línea 4: *sec* (102pb),
Línea 5,6,7,8,9 negativos,
Línea 10: *sea* (270pb)

V. DISCUSIÓN

Staphylococcus aureus está relacionado en intoxicación alimentaria por su habilidad de producir gran variedad de toxinas extracelulares (15). Dinges, 2001(23) menciona que las exotoxinas de *S. aureus* cuando son ingeridas con el alimento pueden provocar náuseas, vómitos y calambres abdominales en aproximadamente 4 horas después de la ingestión de los alimentos. Considerando que las enterotoxinas estafilocócicas son importantes por ser los principales agentes de intoxicación de origen bacteriana para el hombre por lo que su detección es esencial para un diagnóstico preciso y vigilancia de alimentos (29).

En este estudio, se analizaron quesos, embutidos y cremas de pastelería alimentos de amplio consumo en la población, que debido a la riqueza de sus nutrientes y consumo rápido se contaminan fácilmente con *S. aureus* generalmente debida a portadores durante el procesamiento o manipulación (65). Es así que Becker, 1996 (9) menciona que los alimentos más asociados a intoxicación alimentaria estafilocócicas son las ensaladas frías, ensaladas de pollo, cremas, quesos y jamón cocido. Los resultados del análisis de las muestras de queso presentaron una elevada contaminación de *Staphylococcus aureus* (75%) en comparación a los embutidos (44%) y cremas (0%), este resultado se explica debido a que el alto porcentaje de humedad favorece al desarrollo de la bacteria, aislándose por ello preferentemente a partir de quesos frescos que corresponde a los quesos que se han tomado para el estudio. (2)

De las 60 muestras de queso analizadas, 28 de ellas tuvieron recuentos de *S. aureus* mayores de 10^5 UFC/ g., estos resultados son parecidos a los de DELGADO, et al. 2003 (22); que Evaluaron la calidad bacteriológica de los quesos frescos artesanales que se expenden en los mercados municipales de Pueblo Libre, Perú encontrando recuentos de *S. aureus* de 3.1×10^5 CFU/g. encontrando que el 87.2%

de muestras de quesos presentan valores mayores a los permitidos por la Norma Técnica Peruana 202.087

De las muestras de cremas analizadas, todas fueron negativas a la presencia de *Staphylococcus aureus*, es necesario indicar que las cremas de pastelería analizadas estaban conservadas en refrigeración al momento del expendio y que como refiere algunas investigaciones las condiciones de almacenamiento son necesarios para el crecimiento de *S. aureus*, tal como menciona PARRILLA et al, 1993 (65) en un estudio sobre brotes de toxiinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario en la Ciudad de México que la crema pastelera a temperatura ambiente es un excelente medio de cultivo para este germen, así mismo estudios similares reportan incidencia baja de *S. aureus* en cremas tal como lo muestra la investigación de CARRERA et al, (20) que en un estudio sobre Vigilancia de *S. aureus* en alimentos desde enero de 1995 hasta junio 1997 en establecimientos de producción, expendio o consumo reportan que solo un 8% la de productos de repostería a base de crema o rellenos con carne o queso presentaban contaminación con *S. aureus*

De las muestras de embutidos, el 44% de muestras analizadas fueron positivas a *S. aureus* de las cuales sólo el 17% de ellas presentaron recuentos mayores de 10^5 UFC/ g, estos resultados están de acuerdo con ATANOSSAVA et al 2001 (4) en su estudio sobre las prevalencia de *S. aureus* y enterotoxinas en cerdo crudo y jamón a utilizando técnicas de cultivo clásico y técnicas biológicas moleculares (PCR) reporta que de las 135 muestras de cerdo crudo, carne salada y el jamón ahumado listo para venta que fueron examinadas encontraron que en el 25.9% de las muestras se encontró *S. aureus* así mismo sólo 24 de las 135 muestras examinadas (34.8%) de especies estafilocócicas examinadas usando la técnica de PCR eran enterotoxigénicas..

Según estudios niveles de Contaminación superiores a 10^5 UFC/ gr pueden favorecer la producción de enterotoxinas estafilocócica en condiciones ambientales adecuadas tal como lo reporta BECQUER, A. 1997 (10); FILHO et al, 2000 (25); MARTINEZ O, 1991 (52) quienes mencionan que existe una relación directa entre el número de unidades formadores de colonia por gramo y la probabilidad de la presencia de alguna de las enterotoxinas de *S. aureus*, así también DINGES, 2001 (23) refiere que algunas cepas de *S. aureus* cuando están presentes en cantidades elevadas en un alimento ($>10^5$ UFC/ g) en condiciones adecuadas de temperatura, pH, aw y oxígeno producen una o más enterotoxinas estafilocócicas en los alimentos. En tanto que BORGES, et al. 2008 (14) menciona que la ocurrencia de enterotoxinas estafilocócicas parece estar relacionada a la habilidad de las cepas en producir enterotoxinas más que al grado de contaminación por *S. aureus* debido a que investigaciones evidenciaron la producción de la enterotoxina por debajo de los 10^5 UFC/ g. en quesos y lo contrario, recuentos mayores a 10^5 UFC/ g no fueron detectados enterotoxinas.

Según Becquer et al 1997 (10) la termonucleasa se puede detectar en alimentos que contengan concentraciones de microorganismos en el orden de 10^6 UFC / g. *El Scientific Committee On Veterinary Measures Relating To Public Health* (72) en su Opinión sobre enterotoxinas estafilocócicas en productos lácteos, sostiene que las enterotoxinas estafilocócicas y las TNasa son muy estables a los procesos, tales como calentamiento, fermentación, secado etc., y se detecta en los alimentos con recuentos de *S. aureus* entre 10^5 a 10^6 UFC / g. Por tanto puede ser alternativa adecuada la búsqueda de Termonucleasa (Tnasa) en los alimentos ya que sirve como un indicador de la presencia de la toxina a niveles elevados. En nuestro estudio se detectó termonucleasa en el 82% de muestras de *S. aureus* analizadas pero solo el 15% de ellas presentaron alguno de los cinco genes de enterotoxinas. Este resultado es comparable al de SUARES et al, 2008 (76) quienes estudiaron la posible correlación de la presencia del gen de enterotoxina A con la producción de las enzimas coagulasa y termonucleasa demostrando que no existe correlación entre las

tres variables, por tanto no es confiable utilizar pruebas presuntivas o indirectas para determinar la enterotoxigenicidad en cepas de *S. aureus*.

La detección de toxinas estafilocócicas aún se basan principalmente en métodos inmunológicos tediosos, y que dependen de la cantidad de la toxina que se produce. En los últimos años se ha considerado esencial desde el punto de vista epidemiológico y de diagnóstico, la detección por PCR de los genes que codifican estas toxinas (54). En el presente estudio se utilizó la técnica Múltiplex PCR para detectar los genes de las toxinas de la A a E en una sola reacción producidas por cepas de *S. aureus*. Los primers utilizados tenían las secuencias de genes para enterotoxinas que comprendían a los cinco tipos de genes clásicos como son el SEA, SEB, SEC, SED, y SEE. Las cepas escogidas para el análisis del PCR multiplex fueron las aisladas de quesos que presentaron recuentos mayores a 10^5 *S. aureus* UFC/g y con reacción positiva a la prueba de la termonucleasa, encontrando que sólo el 15% de las muestras analizadas presentaron genes para enterotoxinas clásicas, SEA, SEB, SEC, SED, y SEE. (59, 73,). Estos resultados coinciden con los de Pepe et al ,2006 (66) que examinaron la presencia de *S. aureus* y de la enterotoxina SEA en empanadas de pollo de un supermercado de Italia, de 20 muestras sólo en 03 muestras encontraron genes de enterotoxinas a pesar del alto porcentaje de *Estafilococos coagulasa* positivo (66)

Así mismo, de las muestras negativas a la presencia de genes de enterotoxinas estafilococias clásicas se puede decir que corresponden a cepas no enterotoxigénicas o pueden corresponder a otras enterotoxinas con genes distintos para los que no se utilizó los primers correspondientes, tal como lo reportan algunos estudios, de aislamientos realizados en alimentos, existen cepas de *S. aureus* que poseen genes que codifican nuevas enterotoxinas (6, 12, 44, 61, 69). La investigación de **BANIA, J**, 2006. (6) que estudió el genoma de los *S. aureus*, ha permitido la identificación de nuevos genes que codifican enterotoxinas como superantígenos (SEIs) algunas de estas se consideran implicadas en intoxicación alimentaria

estafilocócica, reportando que de 50 cepas de *S. aureus* analizadas, 27 mostraron ser enterotoxigénicas, de las cuales solo 9 presentan los genes para enterotoxinas comunes (SEA-SEE) y 18 cepas son SEA-SEE- negativas; por tanto detectó la presencia de nuevos genes productores de enterotoxina, se demostró así mismo que el gen que codifica la enterotoxina H (SEIH) fue el más frecuentemente detectado (n = 14), mientras que genes que codifican SEII junto con SEIG fueron detectados en tres cepas. Así también **POLI, et al** 2007 (69) reporta que en cepas de *S. aureus* aislados de quesos los genes de enterotoxinas más predominantes fueron los genes *ser*, *sed*, *seg*, y *sem* (69). Estos resultados al igual que el de este estudio apoyan la necesidad de trabajos adicionales sobre la detección de nuevos genes enterotoxigénicos y su papel en la intoxicación alimentaria o en su defecto controlar su presencia en *S. aureus* aislados de alimentos.

VI. CONCLUSIONES

Realizado el presente trabajo de investigación se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. El 75% de los quesos analizados se encontraban contaminados con *Staphylococcus aureus* y el 46% de ellas tenían recuentos mayores a 10^5 UFC/g.
2. El 44% de embutidos analizados se encontraban contaminados con *S. aureus* y el 17% de ellas tenían recuentos mayores a 10^5 UFC/g.
3. Las muestras de cremas chantilli no presentaban contaminación con *S. aureus*
4. El 15% de los *S. aureus* termonucleasa positivos tenían uno de los genes de enterotoxinas, SEA, SEB y SEC respectivamente.
5. El 85% de *S. aureus* con reacción positiva a la termonucleasa y con recuentos mayores a 10^5 UFC/g no presentaron ningún gen para las enterotoxinas clásicas (SEA, SEB, SEC, SED, SEE).

VII. RECOMENDACIONES

1. Las buenas condiciones de higiene se deben mantener en cuanto al almacenamiento y forma de expendio de quesos y embutidos hasta su consumo para prevenir la contaminación con *Staphylococcus aureus*
2. Se debe investigar nuevos genes enterotoxigénicos (*seg*, *seh*, *sei*, *sej*,) de *S. aureus* en los alimentos, principalmente en quesos y su papel en la intoxicación alimentaria.
3. La implementación de técnicas más rápidas y eficaces como el desarrollo de nuevos y eficientes protocolos de PCR para la detección de microorganismos patogénicos para el hombre que están presentes en los alimentos es fundamental para la producción de nuevos conocimientos técnicos que posibiliten una adecuada acción sanitaria.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ABE, J.; ITO, Y.; ONIMARU, M.; KOHSAKA, T.; TAKEDA, T. 2000. Characterization and distribution of a new enterotoxin-related superantigen produced by *Staphylococcus aureus*. Microbiology and Immunology, **44** (2) p. 79-88
2. AMTMANN R.M.P. 1999. Caracterización microbiológica de quesos elaborados por pequeños productores de leche bovina de la Comuna de los Muermos, Provincia de Llanquihue. Tesis de Grado Licenciado en Medicina Veterinaria. Universidad Austral de Chile.
3. ANUNCIAÇÃO L. L.; LINARDI W.R.; DO CARMO, L.S; S.M. BERGDOLL. 1994. Production of Staphylococcal enterotoxin a in white cheese. Rev. Microbiol. São Paulo. **25** (1) p. 68-71
4. ATANOSSAVA, V., MEINDL, A. AND RING, C. 2001.Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham – a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. *International Journal of Food Microbiology* V. **68**, p. 105–113.
5. BACHERT, P. GEVERT,P. VAN CAUWENBERGE. 2002. *Staphylococcus aureus* enterotoxins: a key in airway disease? *Allergy*:57:480-487
6. BANIA ,J.; DABROWSKA, A.; BYSTRON, J.; KORZEKWA' K. ; CHRZANOWSKA, J.;MOLENDNA, J. 2006. Distribution of newly described enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* from food. *International Journal of Food Microbiology*, **108**(1):36-41,
7. BECKER,K; ROTH, R, PETERS G. 1998. Rapid and Specific Detection of Toxigenic *Staphylococcus aureus*: Use of two Multiplex PCR Enzyme

Immunoassays for Amplification and Hybridization of Staphylococcal Enterotoxin Genes, Exfoliative Toxin Genes, and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Gene. *Journal of Clinical Microbiology*. **36**(9) 2548-2553

8. BECKER,K; FRIEDRICH W.; LUBRITZ G.; WEILERT, M.; PETERS G.; VON EIFF,C. 2003. Prevalence og Genes Encoding Pyrogenic Toxin Superantigens and Exfoliative Toxins among Strains of *Staphylococcus aureus* isolated from Blood and Nasal Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. **41**(4) .p.1434-1439.

9. BECQUER, A.; MOTA DE LA GARZA L; LARA. C. 1996. Importancia de la detección de enterotoxinas estafilocócicas. *Revista Cubana Alimentaria. Nutr.* ; **10**(2)

10. BECQUER, A.; V. LEYVA; LARA. C.; L. MOTA DE LA GARZA.L 1997. *Staphylococcus aureus*, actividad termonucleasa y enterotoxinas en alimentos. *Rev. Cubana Aliment. Nutr.*; **11**(2)

11. BERNADETTE D., GOMBOSSY DE MELO F. 1994. Métodos rápidos de análise microbiológica de alimentos: Estudo critico e avaliação de novas metodologias . Tese apresentada a Faculdade de Ciências farmacêuticas da Universidade de São paulo.

12. BLAIOTTA, G.; ERCOLINE, D.; PENNACCHIA, C.; FUSCO, V.; CASABURI, A.; PEPE, O.; VILLANI, F. 2004. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and seL in *S. aureus* AB-8802. *Journal of Applied Microbiology*. **97**(5) p. 719-730

13. BOOM, R.; SOL C.J; SALIMANS,M.M.; JANSEN C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN M.E.; V.D. NOORDAA. 1990. .Rapid and Simple Method for purification of Nucleic Acids. *Journal of Clinical Microbiology*. **28**(3) p. 495-503
14. BORGES, M.F.; FROEDER. E.; J.L. PEREIRA.; T. FEITOSA; KUAYE. Y. 2008 *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: Revisão. *Boletim do CEPPA, Curitiba* . **26**(1) p.71-86,
15. BORGES, M.F; NASSU R.T; PEREIRA,J.L; DE ANDRADE C.; KUAYE A. Y. 2008. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. *Ciência Rural, Santa Maria*, .**38**(.5) p.1431-1438
16. BRETT, M.M. 1998. Kits for the detection of some bacterial food poisoning toxins: problems, pitfalls and benefits. *Journal of Applied Microbiology symposium Supplement*. **84**. 110-118
17. CABRAL, K. G., C. LAMMLER, M. ZSCHOCK, H. LANGONI, M. E. DE SA, C. VICTORIA, AND A. DA SILVA. 2004. Pheno- and genotyping of *Staphylococcus aureus*, isolated from bovine milk samples from São Paulo State, Brazil. *Can. J. Microbiol*. **50**:901-909
18. CÁNDIDA DÍAZ-RIVERO Y BEDIRVA GONZÁLEZ DE GARCÍA . 2001. *Staphylococcus aureus* en queso blanco fresco y su relación con diferentes microorganismos indicadores de calidad sanitaria RESPYN. Vol 2 No.3 Julio-Septiembre. WWW.respyn.uanl.mx/ii/3articulos/saureus-1.html

19. CARBALLO JAVIER. Resumen de adherencia de bacterias a superficies de contacto con alimentos. Revista de Tecnologia e higiene de los alimentos. ISSN 030057755 Nro. 320, 2001 pag 19-26. <http:// Dialnet unirioja.es/servlet/articulo?codigo =133848>
20. CARRERA J. A.; CABALLERO. A; LENGOMIN M.E. 1998. Vigilancia de *Staphylococcus* y *Salmonella* en alimentos. Rev. Cub. Aliment. Nutr. **12**(1) p. 16-19: http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol12_1_98/ali03198.pdf
21. CREMONESI, P.; PEREZ, G.; PISONI,G.; MORONI,P.; MORANDI.S.; LUZZANA, M.; BRASCA, M. and CASTIGLIONI, B. 2007. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. Letters in Applied Microbiology . **45**. p586-591
22. CRISTÓBAL D. R; MAURTUA T.D. 2003. Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus* spp.. *Rev Panam Salud Publica* [online]**14** (3) p. 158-164. ISSN 1020-4989.
23. DINGES,M.; ORWIN. P; P.M. SCHLIEVERT. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*. **13** (01)p. 16-34
24. FERNANDEZ RIBEIRO V. *Avaliação de contribuição para área de vigilância sanitária de alimentos de pesquisas realizadas em programas de Pós-Graduação Strictu Sensu de Universidade de Sao Paulo*. Dissertação apresentado ao Programas de Pós Graduação de Saude Publica de Faculdades de Saude Publica de Universidade de São Paulo para obtenção de Título de Master em Saude Pública

25. FILHO, A. S.; FILHO, N A. 2000. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo “frescal”, **Revista de Saúde Pública**. São Paulo, V.34, n.6, p.578-580,

26. FILHO N. A; FERREIRA L.M.; AMARAL L.A; ROSSI JUNIOR, O.D.; OLIVEIRA, R.P. 2007. Produção de enterotoxinas e da toxina do síndrome choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas na mastite bovina. *Arq. Bras.Med. Vet. Zootec.* **59**(5) p 1316-1318

27. FITZGERALD, J.R., MONDAY, S.R., FOSTER, T.J., BOHACH, G.A., HARTIGAN, P.J., MEANEY, W.J., SMYTH, C.J., 2001. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *J. Bacteriol.*, 183, 63-70.

28. FUEYO.J.M.; MARTIN M.C; GONZALEZ-HEVIA, M.A.; MENDOZA,M.C. 2001. Enterotoxins production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food samples. Relations between genetic types and enterotoxins. *International Journal Food Microbiology*. 67 . 139-145

29. FUEYO MENDOZA J. M. 2005. .Frecuencia y tipos de toxinas *superantigenos Staphylococcus aureus* de diferentes orígenes: relaciones con tipos genéticos. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo.

30. FUEYO.J.M., C. .MENDOZA, MARTIN M.C .2005. Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal Carriers and manually handled food: epidemiological and genetic findings. *Microbes and infection*. **7** . 187-194

31. FUJIKAWA, H; IGARASHI H.1988. Rapid Latex Agglutination Test for Detection of Staphylococcal Enterotoxins A to E That Uses High –Density Latex Particles. *Applied and environmental Microbiology*. **54**(10) p 2345-2348

32. FREITAS, E. I. 2005. Detecção de genes de enterotoxinas de *Staphylococcus* spp. Isolados de queijos minas frescal. Dissertação apresentado ao Programas de Pós Graduação em vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau Mestre.
33. GILLETTO, A.; FYFFE, JC. 1998. A novel ELISA format for the rapid and sensitive detection of staphylococcal enterotoxin A. *Biosci-Biotechnol-Biochem.* 62(11)
34. GONZALES F, T. ROJAS H. 2005. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y Diagnóstico. *Salud pública de México.* 47 (05)
35. GOTO. M.; HAYASHIDANI,H.; TAKATORI.K.; HARA-KUDO.Y. 2007. Rapid detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* harbouring genes for four classical enterotoxins, SEA, SEB, SEC and SED, by loop-mediated isothermal amplification assay. *Letters in Applied Microbiology.* 45 p.100-107
36. HEIN, I.; LEHNER,A.; RIECK, P.; KLEIN, K.; BRANDL,E.; M. WAGNER. 2001. *Applied and Enviromental Microbiology.* 67(7) p. 3122-3126
37. HURTADO, M. P., DE LA PARTE, M. A. e BRITO, A. 2002, *Staphylococcus aureus*: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* [online] 22 (2) 112-118.
38. http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562002000200003&lng=pt&nrm=iso.

39. ICMSF, 1996 Microorganisms in Foods.5. Characteristic of Microbial Pathogend. International Commission on Microbiological specifications for Foods (ICMSF). London. Blackie Academic & Professional.

40. ICMSF, 1999. Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para alimentos – Microorganismos de los Alimentos 1: Su significado y método de numeración. 2da. Edición. Ed. Acribia . Zaragoza. España.

41. ICMSF, 2000. Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para alimentos – Microorganismos de los Alimentos 2: Métodos de muestreo para análisis microbiológicos: Principios y aplicaciones específicas. 2da. Edición. Ed. Acribia . Zaragoza. España

42. KARP, GERAL, 2006. Biología Celular y Molecular. Conceptos y experimentos. 2da. Edic. Editorial Mac Graw-Hill.

43. KLOTZ, M.; OPPER, S.; HEEG,K.; S. ZIMMERMANN. 2003. Journal of Clinical Microbiology. **41**(10)

44. KOKAN, N. P., AND M,S. BERGDOLL. 1987. Detection of low-enterotoxin producig *Staphylococcus aureus* strains. Appl. Envirom. Microbiol. **53**

45. KWON, S. H. KIM, K. T. PARK, W. K. BAE, J. Y. KIM, J. Y. LIM, J. S. AHN, K. S. LYOO, J. M. KIM, W. K. JUNG, K. M. NOH, G. A. BOHACH, Y. H. PARK. 2004. Application of extended single-reaction multiplex polymerase chain reaction for toxin typing of *Staphylococcus aureus* isolates in South Korea. **International Journal of Food Microbiology** v.97 Pag. 137-145,

46. LEE, A.C.N.ROBBINS, and M.S.BERGDOLL. 1980. Isolation of specific and common antibodies to staphylococcal enterotoxina B, C₁ and C₂. Infect. Immun. Vol. 27.
47. LE LOIR, Y., BARON, F. AND GAUTIER, M.. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning . Genetics and Molecular Research. 2 (1): 63-76.
48. LUJÁN D., M. VALENTÍN, M. MOLINA. 2006. Evaluación de la presencia de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos artesanales en tres distritos de Lima-Perú. Revista de Salud Publica y Nutrición (RESPYN) abril-junio 7(2) http://www.respyn.uanl.mx/vii/2/articulos/quesos_frescos-1.htm
49. MADIGAN T., MARTINKO J. y J. PARKER. 2003. Brock Biología de los microorganismos. 8va. Edición. Prentice Hall. España.
50. MANDELL GL. BENNETT, and R. DOLIN. 2000. Principios y práctica de las enfermedades infecciosas. Quinta edición.
51. MARQUEZ, J G.; GARCIA C. 2007. Microflora patógena del queso blanco “telita” elaborado en cuatro estados de Venezuela. *An Venez Nutr.* [online]. 20(1).
http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-07522007000100004&lng=es&nrm=iso.
52. MARTIN, M.C; FUEYO,J.M.; GONZALES-HEVIA, M.A.; M.C MENDOZA. 2004. Identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks. *Internacional Journal of Food Microbiology*. **94** p. 279-286.
53. MARTINEZ ORDINOLA, Nancy. 1991. Enterotoxigenicidad de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de Jurel (*Trachurus simetricus murphy*) y

Merluza (*Merluccius gayi peruanus*) congelados y comercializados en los Mercados de Lima. Tesis UNAM- Lima.

54. MEHROTRA, M.; WANG,G.; JOHNSON,W.M. 2000. Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance. *Journal Of Clinical Microbiology*, v. 38, p.1032-1035.

55. MENDEZ A. S., E. PEREZ ROTH. 2004. La PCR en Microbiología Clínica. *Enferm. Infecc. Microbiol Clin*; **22**(3): 183-92.

56. MEYRAND, A. BOUTRAND ,L.; RAY,G.; MASUY,C.; GASPARD,C.; JAUBERT,G; PERRIN.G.; LAPEYRE.C and R. VERNZOY. 1998. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert. Type cheeses from raw goats' milk. *Jornal Applied Microbiology*. **85**(3)

57. MEYRAND, A.; BOUTRAND-LOELS,S.; RAY-GUENIOT,S.; MAZUY C.; GASPARD, C.; JAUBERT,G; PERRIN G.; LAPEYRE.C; VERNZOY-ROZAND.C; 1999. Evaluation of an alternative procedure for enterotoxin determination in dairy products. *Letters in Applied Microbiology*. 28(6.)

58. MONDAY, S. R.; BONACH, G. A. 1999. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, **37**(10) 4311-4314, .

59. MUNSON, S, H .; TREMAINE,M.T; BETLEY,M.J; WELCH, R.A. 1998. Identification and characterization staphylococcal enterotoxins of type G and from *Staphylococcus aureus* . *Infection and immunity*. V, 66. N°07.

60. NORMANNO A.; VIRGILIO; G. MULA; A. DAMBROSIO; A. POGGIU; L. DECASTELLI; R. MIONI; S. SCUOTA; G. BOLZONI; E. DI GIANNATALE; A. P. SALINETTI; G. LA SALANDRA; M. BARTOLI;

- F. ZUCCON; T. PIRINO; S. SIAS; A. PARISI; N. QUAGLIA; V. CELANO. 2005. Coagulase-positive **Staphylococci and *Staphylococcus aureus*** in food products marketed in Italy. *International Journal of Food Microbiology* v.98 Pag. 73-79,
61. OLIVE, M.; P. BEAN. 1999. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *Journal Of Clinical Microbiology*. V. 37 N°06
62. OMOE, K.; ISHIKAWA, M.; YU, S.; HU, D.L.; UEDA, S.; SHINAGAWA, K. 2002. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productive of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. **Journal of Clinical Microbiology**, **40** (3) p. 857-862
63. ORWIN, P.M., LEUNG, D.Y.M., DONAHUE, H.L., NOVICK, R.P., SCHLIEVERT, P.M. 2001. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. *Infect. Immun.*, **69**(1), 360-366.
64. ORWIN, P. M.; FITZGERALD, J. R.; LEUNG, D. Y. M.; GUTERREZ, J. A.; BOACH, G. A.; SCHLIEVERT, P. M. 2003. Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. *Infection and Immunity*, . **71** (2). 2916-2919.
65. PARK. C.E., AKHTAR, M, and K. RAYMAN. 1994 .Evaluation of a Commercial Enzyme Immunoassay Kit (RIDASCREEN) for Detection of Staphylococcal Enterotoxins A; B, C, D, and E in Foods. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**(2) p. 677-681
66. PARRILLA M.C.; VASQUEZ J.L.; SALDATE E.O.; NAVA L.M. 1993. Brotes de Toxiinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario. *Salud Pública Méx*; **35**(5) p 456-463

67. PEPE, O.; . BLAIOTTA, G.; BUCCI, F.; ANASTASIO, M.; APONTE, M.; F. VILLANI. 2006. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxin A in Breaded Chicken Products: Detection and Behavior during the Cooking Process Applied and Environmental Microbiology, (72) 11.
68. PERSING, D.; T.F. SMITH, F.C. TENOVER. 1993. Diagnostic Molecular Microbiology. Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications. 641 páginas
69. PINTADO. M, A.C. MACEDO AND F.X. MALCATA. 2001. Review: Technology, Chemistry and Microbiology of Whey Cheeses. *Food Sci Tech Int* 7(2):105–116
70. POLI, A.; GUGLIELMINI,E.; SEMBENI,S.; SPIAZZI, M.; DELLAGLIO,F.; F.ROSSI and TORRIANI.S. 2007. Detection of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin genotype diversity in Monte Veronese, a Protected Designation of Origin Italian cheese. Letters in Applied Microbiology. **45** p. 529-534.
71. RAPINI, L.S. CERQUEIRA, O.P.; CARMO.L.S.; VERAS. J.F.; SOUZA. M.R. 2005. Presença de *Staphylococcus* spp. Produtores de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico em manipuladores de queijo de cabra. *Arq. Bras.Med. Vet. Zootec.* **57**(6) p. 825-829
72. SCHLIEVERT P.M.; JABLONSKI L.M.; ROGGIANI M.; SADLER I.; CALLANTINE S, MITCHELL.D.; OHLENDORF.D.; G.A. BONACH. 2000. Pyrogenic Toxin Superantigen Site Specificity in Toxic Shock Syndrome and Food Poisoning in Animals. *Infection and Immunity.* **8** (6). P.3630-3634

73. SCIENTIFIC COMMITTEE ON VETERINARY MEASURES RELATING TO PUBLIC HEALTH, 2003. Staphylococcal enterotoxins in milk products, particularly cheeses
74. SHARMA, NK. REES, C.E.D.; DODD, C.E.R. 2000. Development of a single-reaction multiplex PCR typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. **Applied Environmental Microbiology**. V. 66. N° 4 p. 1347-1353.
75. SILENE CATIA K., ZOTTI T., GAVA A., PELISSER MARCIA. Qualidade microbiológica de salames tipo colonial comercializados na cidade de Concordia-SC: análise de *Staphylococcus aureus* e *Toxoplasma gondii*. Comunicado técnico, 446. Ministerio da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Dezembro 2006.
76. SU. Y.C.; WONG, L. Identification and Purification of a new Staphylococcal Enterotoxin, H. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol.61, No. 4. pp1438-1441. April 1995
77. SUARES, M. J; ARIAS, M. L; GAMBOA, M. 2008. Detección de la enterotoxina A de *Staphylococcus aureus* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y su correlación con las pruebas de coagulasa y termolisinasa. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* **58**(1) p. 59-63.
78. Swaminathan, S., Furey, W., Pletcher, J. and Sax, M., 1995. Residues defining V beta specificity in staphylococcal enterotoxins. *Nature Struct. Biol.* **2**, 680-686. [Medline Abstract](#);

Anexos

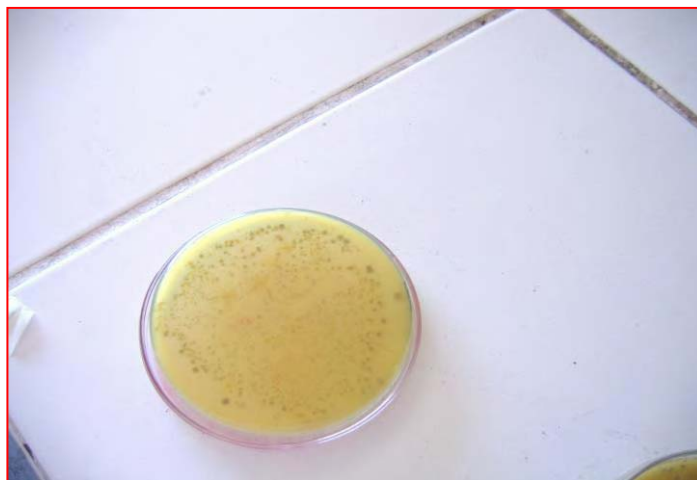


Figura A-1: Colonias de *S. aureus* en agar Baird Parker

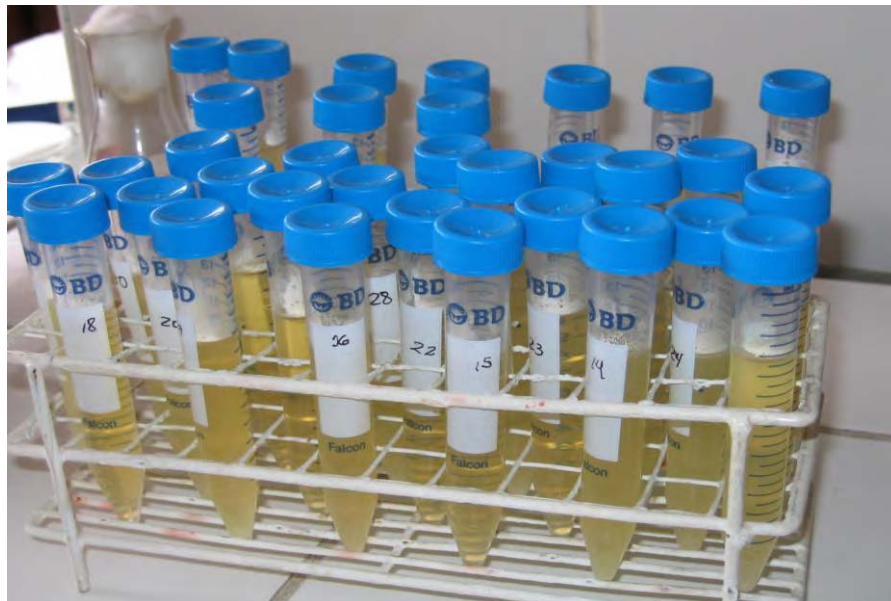
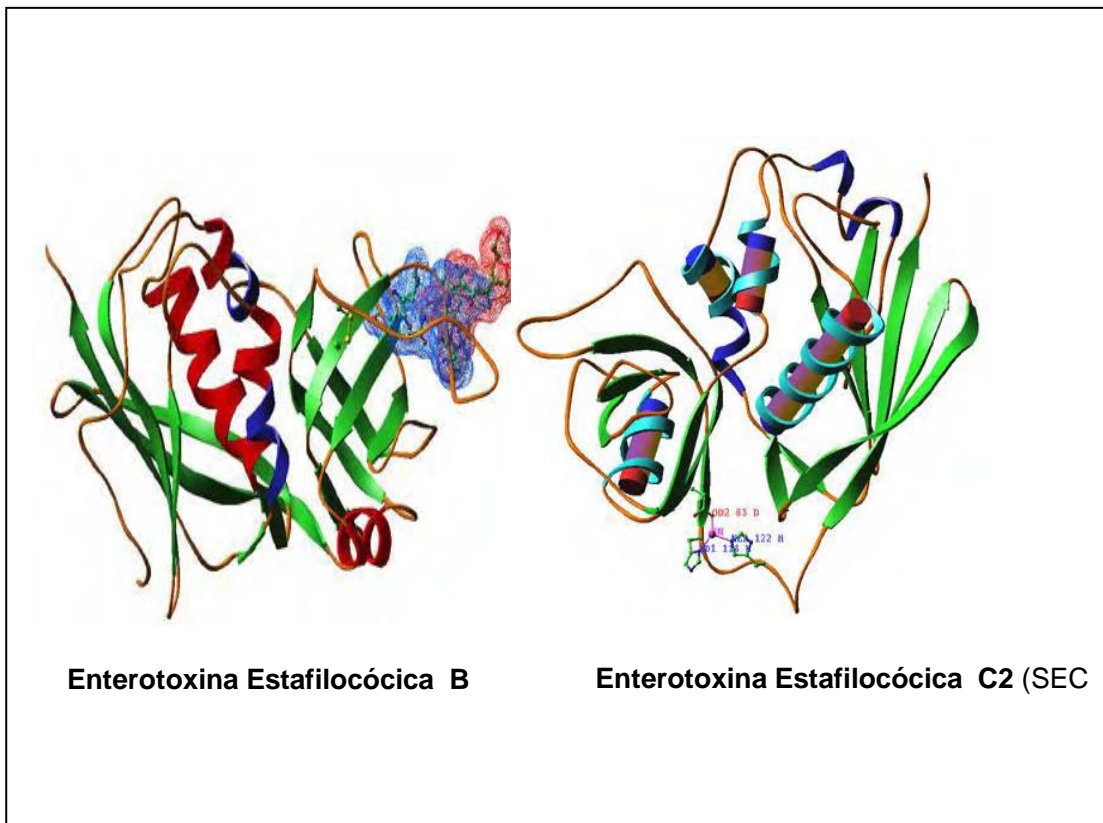
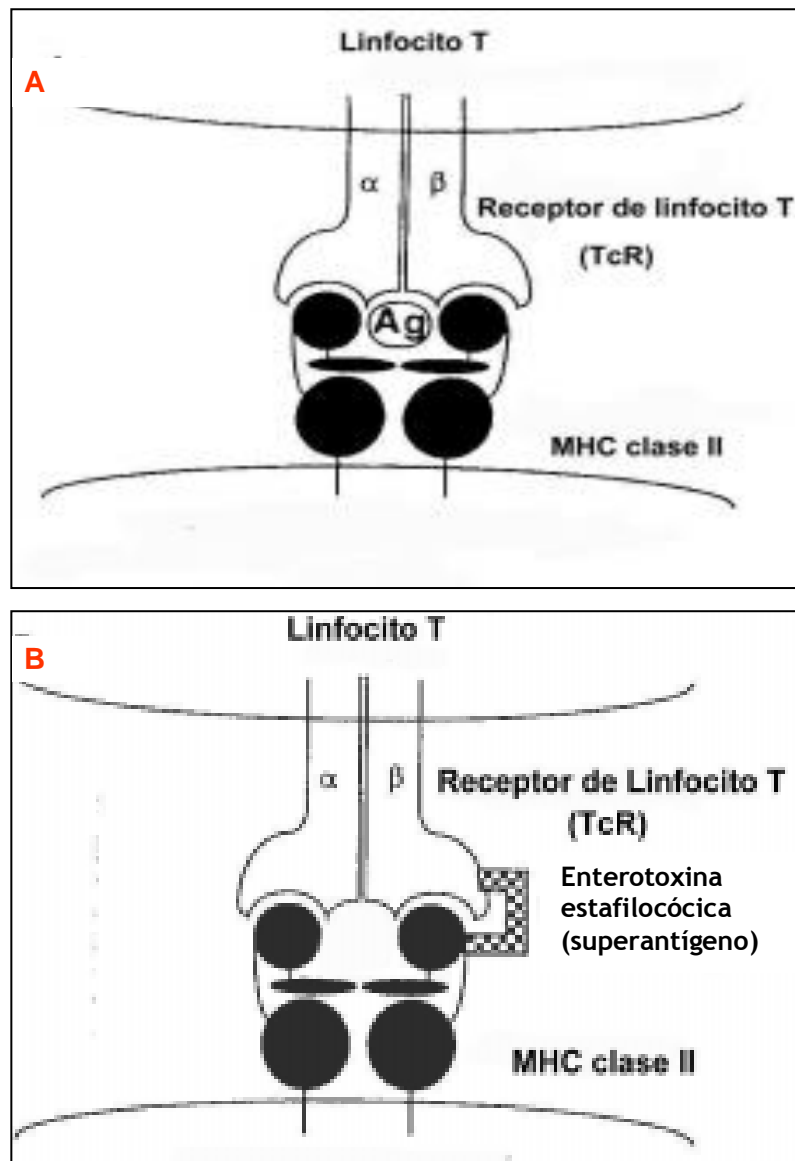


Figura A-2: Cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de alimentos conservadas en agar TSA



Fuente: Imagen tomada de www.biology.bnl.gov/.../images/swami_seb.jpg

Figura A-3: Estructura de dos tipos de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* B y C2, constituida fundamentalmente por estructuras beta, aunque también se halla estructuras de hélice alfa.



Fuente: Adaptación de LE LOIR, et al 2003 (78)

Figura A-4:

- A)** Presentación hipotética de la interacción de un antígeno a las moléculas de la Clase II MHC de la célula presentadora de antígeno y el TCR (receptor linfocito T). El antígeno (Ag) está representado en el surco de las moléculas MCH presentadoras del antígeno y hace contacto con las cadenas alfa y beta del receptor del Linfocito T.
- B)** Modelo que muestra la actividad de las enterotoxinas estafilocócicas (superantígenos). Las toxinas estafilocócicas se unen al MHC y al TCR no en las zonas de reconocimiento específico, sino en las adyacentes, y se activan numerosísimas clonas de células T de distinta especificidad antigénica,

Tabla A-1: PARAMETROS IMPORTANTES PARA EL DESARROLLO DE *S. aureus* Y PRODUCCIÓN DE ENTEROTOXINAS EN ALIMENTOS

Parámetro	Crecimiento microorganismo		Producción de enterotoxinas	
	óptimo	Variación	óptimo	Variación
Temperatura (°C)	35-37	7-48	40-45	10-48
pH	6,0-7,0	4,0-10,0	7,0-8,0	4 -9,6
Aw	>0.98	0.83- >0.99	0.99	0.83- >0.99
NaCl (%)	0	0-20	0	0-10
Atmósfera	Aeróbica	Aeróbica- Anaeróbica	Aeróbica	Aeróbica Anaeróbica

Fuente: SCIENTIFIC COMMITTEE ON VETERINARY MEASURES RELATING TO PUBLIC HEALTH, 2003 (72)